


 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : G01N 33/543, 33/544, 33/68, C07C 229/26, B01D 15/08, G01N 21/55	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 96/09547 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 28. März 1996 (28.03.96)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP95/03731 (22) Internationales Anmeldedatum: 21. September 1995 (21.09.95) (30) Prioritätsdaten: P 44 33 980.1 23. September 1994 (23.09.94) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH [DE/DE]; Postfach 200, D-55216 Ingelheim am Rhein (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): STEINLEIN, Peter [DE/AT]; Rembrandtstrasse 10/4, A-1020 Wien (AT). ZAUNER, Wolfgang [AT/AT]; Rennweg 72/2/14, A-1030 Wien (AT). HABERMANN, Bianca [AT/AT]; Anastasius-Grüngasse 54/II, A-1180 Wien (AT). (74) Gemeinsamer Vertreter: BOEHRINGER INGELHEIM IN- TERNATIONAL GMBH; Postfach 200, D-55216 Ingelheim am Rhein (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, CN, JP, KR, MX, NZ, PL, RU, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
(54) Title: PROCESS OF INVESTIGATING THE INTERACTION BETWEEN BIOMOLECULES BY MEANS OF SURFACE PLASMON RESONANCE		
(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR UNTERSUCHUNG DER WECHSELWIRKUNG VON BIOMOLEKÜLEN MITTELS OBERFLÄCHEN-PLASMON-RESONANZ		
(57) Abstract The invention concerns a process, a biosensor unit which can be regenerated and suitable kits for investigating the interaction between biomolecules by means of surface plasmon resonance (SPR). One of the reagents, a (poly)peptide, is coupled to the surface of the biosensor unit by means of a metal chelate. Nitrilotriacetic acid derivatives to which proteins with an affinity peptide containing histidine groups can be bonded are preferably used as chelate formers.		
(57) Zusammenfassung Verfahren und regenerierbare Biosensoreinheit sowie geeignete Kits zur Untersuchung der Wechselwirkung von Biomolekülen mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR), wobei einer der Reaktionspartner, ein (Poly)Peptid, mittels Metallchelat an die Oberfläche der Biosensoreinheit gekoppelt ist. Bevorzugt als Chelatbildner sind Nitrilotriessigsäure-Derivate, mit denen Proteine mit einem Histidin-Reste enthaltenden Affinitätspeptid gebunden werden können.		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

Verfahren zur Untersuchung der Wechselwirkung von Biomolekülen mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz

Die Erfindung bezieht sich auf die Untersuchung der biospezifischen Wechselwirkung von Molekülen.

Die Analyse intermolekularer Wechselwirkungen von Makromolekülen, z.B. (Poly)Peptid-(Poly)Peptid- oder (Poly)-Peptid-DNA-Interaktionen wurde in der Vergangenheit im allgemeinen unter Gleichgewichtsbedingungen statt. Die Untersuchung kinetischer Parameter konnte bis vor kurzem, mit wenigen Ausnahmen, nicht oder nur mit Schwierigkeiten durchgeführt werden, weil sie größere Mengen und einen höheren Reinheitsgrad der Makromoleküle erforderte bzw. weil die vorhandenen Methoden, wie die Affinitätschromatographie oder immunologische Methoden, nicht schnell genug sind, um biospezifische Wechselwirkungen zu verfolgen.

Eine kürzlich entwickelte Methode beruht auf dem optischen Phänomen der Oberflächen-Plasmon-Resonanz ("Surface Plasmon Resonance", SPR). Die Auswertung von optischen Signalen, die mit Veränderungen des Brechungsindex an der biospezifischen Grenzfläche korrelieren und die bei Konzentrationsänderungen der Makromoleküle, hervorgerufen z.B. durch Bindung der Reaktionspartner aneinander, erhalten werden, ermöglicht nunmehr, diese Analyse in Echtzeit durchzuführen. Dabei kann mit geringeren Mengen an Makromolekülen ohne radioaktive oder fluoreszierende Markierungen gearbeitet werden, und es werden auch an die Reinheit des Makromoleküls weniger hohe Anforderungen gestellt. Diese Methode wurde u.a. in den PCT-Anmeldungen WO 90/05295 und WO 90/05303 geoffenbart.

Das am weitesten verbreitete System, das auf der "Surface Plasmon Resonance"-Methode beruht und kommerziell erhältlich ist (BIAcore™, Pharmacia Biosensor), weist als eines der Hauptelemente neben dem optischen System und den

Probentransporteinrichtungen eine Bisosensoreinheit in Form eines sog. Biosensor-Chips auf. Dieser besteht aus einem Glasträger, der auf einer Seite eine Goldschicht aufweist, an welche über eine mit Linkergruppen versehene Sperrschicht kovalent eine Hydrogelmatrix aus Carboxymethyl-Dextran gebunden ist. Die Hydrogelmatrix dient einerseits der Immobilisierung eines der Reaktionspartner, andererseits der Bereitstellung des für die Analyse der biospezifischen Wechselwirkung des immobilisierten Makromoleküls mit seinem Reaktionspartner erforderlichen Milieus (Stenberg et al., 1991).

Zur Immobilisierung eines der Reaktionspartner, der im allgemeinen ein (Poly)Peptid ist, an die Hydrogelmatrix wurden bisher die folgenden Methoden verwendet:

- 1) Direkte, irreversible Immobilisierung an die Hydrogel-Oberfläche des Biosensorchips mittels chemischer Methoden.
- 2) Direkte, irreversible Immobilisierung des biotinylierten Reaktionspartners an hydrogelgebundenes Streptavidin oder Avidin
- 3) Indirekte, reversible Immobilisierung durch Bindung über einen hydrogelgebundenen Antikörper des Reaktionspartner

Diese Verfahren weisen jedoch verschiedene Nachteile auf: Verfahren 1) ist von dem Risiko behaftet, daß aufgrund der nicht-gerichteten chemischen Reaktion zwischen hydrogelbildender Substanz und dem (Poly)Peptid, die, in Abhängigkeit der verwendeten Methode, bevorzugt an primären Aminogruppen, Kohlenhydratgruppen oder freien Thiolgruppen des (Poly)Peptids stattfindet, dessen biologische und/oder biophysikalische Eigenschaften in einer nicht oder nur schwer definierbaren Weise beeinflußt werden. Das kann

zur Folge haben, daß das immobilisierte (Poly)Peptid nicht bzw. nicht vollständig in seiner nativen, biologisch aktiven Form vorliegt, weil z.B. der Abschnitt des Moleküls, der mit dem Reaktionspartner interagieren soll, durch eine chemische Gruppierung blockiert oder aufgrund einer Konformationsänderung des Moleküls unzugänglich geworden ist. Da für die Biotinylierung von Makromolekülen grundsätzlich ähnliche Methoden wie für die Kopplung von (Poly)Peptiden verwendet werden, treffen diese Nachteile und somit die Beschränkungen des Verfahrens auch auf das unter 2) angeführte Verfahren zu. Beide Verfahren weisen den zusätzlichen Nachteil auf, daß eine Regeneration der Hydrogeloberfläche, die eine wesentliche Vereinfachung des Verfahrens bei der Durchführung von Serienanalysen mit demselben (Poly)peptid darstellen würde, unter Beibehaltung der biologischen und biophysikalischen Aktivität sehr schwierig ist.

Diese Nachteile können durch Verwendung von Antikörpern (Verfahren 3) umgangen werden, wobei prinzipiell dieselben Verfahren angewendet werden, wie bei Sandwich-Immunoassays, z.B. in der ELISA (Enzyme linked Immuno-sorbent Assay)-Technik. Die Anwendung dieses Verfahrens ist jedoch durch das Erfordernis der Verfügbarkeit von monoklonalen, hochaffinen Antikörpern mit Spezifität für das (Poly)Peptid eingeschränkt. Eine weitere Beschränkung besteht darin, daß die Antikörper nicht mit Epitopen interagieren dürfen, die für die Wechselwirkung mit den zu untersuchenden Reaktionspartnern von Bedeutung sind.

Der vorliegenden Erfindung lag die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Untersuchung der Wechselwirkung von (Poly)Peptiden mit Reaktionspartnern mittels SPR

bereitzustellen, das die Nachteile der bekannten Verfahren nicht aufweist.

Es stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung, Proteine, deren Sequenz aufgeklärt ist, unter Verwendung gentechnischer Methoden als Fusionsproteine mit Sequenzabschnitten, die hohe Affinität für einen Liganden aufweisen (sog. Affinitätspeptiden) herzustellen. Die immobilisierte Metallchelataffinitätschromatographie (IMAC) ist ein weit verbreitetes Verfahren zur Reinigung von Proteinen und Peptiden, bei dem derartige Fusionsproteine mittels Affinitätspeptid an immobilisierte Metallchelate gebunden werden. Unter den verschiedenen Chelatbildnern aus der Gruppe der Iminodiessigsäurederivate zeigen Nitrilotriessigsäurederivate besonders vorteilhafte Eigenschaften, zu denen die extrem hohe Affinität für bestimmte Metallionen, z.B. Cu^{2+} , Ni^{2+} oder Zn^{2+} gehört. Breite Anwendung fand bislang dieses Verfahren unter Verwendung von Nickel als Metallion und Nitrilotriessigsäure als Komplexbildner in der Reinigung rekombinanter Fusionsproteine, die ein Affinitätspeptid mit mindestens einem Histidinrest direkt oder indirekt gebunden aufweisen. Derartige Reinigungsverfahren rekombinanter Proteine wurden unter anderem in den europäischen Patentanmeldungen Nr. 184 355 (wobei Iminodiessigsäure als Komplexbildner verwendet wird) und Nr. 282 042 (wobei Nitrilotriessigsäure und Proteine mit einem Affinitätspeptid mit mindestens zwei benachbarten Histidinresten beschrieben werden) geoffenbart.

Zur Lösung der im Rahmen der vorliegenden Erfindung gestellten Aufgabe wurde von der Überlegung ausgegangen, das von der Metallchelataffinitätschromatographie (IMAC) her bekannte Verfahren zu modifizieren.

Affinitätschromatographie bekannte Prinzip für die SPR-Methode auszunutzen.

Die vorliegende Erfindung betrifft somit ein Verfahren zur Untersuchung der Wechselwirkung eines (Poly)Peptids mit einem Reaktionspartner mittels einer Biosensoreinheit, in welcher die durch die Wechselwirkung ausgelöste Oberflächen-Plasmon-Resonanz in einer metallischen Schicht an der Grenzfläche zweier für elektromagnetische Strahlung durchlässiger Medien mit unterschiedlichem Brechungsindex bestimmt wird, wobei das Medium mit geringerem Brechungsindex ein wässriges Medium ist, in welchem das (Poly)Peptid in immobilisierter Form vorliegt und mit dem Reaktionspartner in Berührung gebracht wird. Das Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß das (Poly)Peptid über ein Metallchelat immobilisiert ist.

Die Erfindung betrifft in einem weiteren Aspekt eine Biosensoreinheit für die Untersuchung der Wechselwirkung eines (Poly)Peptids mit einem Reaktionspartner mittels Bestimmung der Oberflächen-Plasmon-Resonanz in einer metallischen Schicht an der Grenzfläche zweier für elektromagnetische Strahlung durchlässiger Medien mit unterschiedlichem Brechungsindex, wobei das Medium mit geringerem Brechungsindex ein wässriges Medium ist. Die Biosensoreinheit ist dadurch gekennzeichnet, daß an seine dem wässrigen Medium zugewandte Oberfläche ein Chelatbildner, gegebenenfalls in mit einer Metallion komplexierter Form, gebunden ist.

In einem bevorzugten Aspekt ist die wässrige Phase eine biokompatible poröse Matrix, insbesondere ein Hydrogel. Hinsichtlich der Hydrogelbildner besteht grundsätzlich keine Beschränkung, sofern ihre Eignung

für das SPR-Verfahren, insbesondere im Hinblick auf die erforderliche Diffusion der Biomoleküle in der Hydrogelmatrix, grundsätzlich gegeben ist. Beispiele für geeignete Hydrogelbildner sind Polysaccharide, wie Agarose, Dextran, Carragen, Alginate, Stärke, Zellulose bzw. Derivate dieser Polysaccharide, wie z.B. Carboxymethylderivate, oder wasserquellbare organische Polymere, wie Polyvinylalkohol, Polyacrylsäure, Polyacrylamid oder Polyethylenglycol.

Ein besonders geeignetes Hydrogel besteht aus Dextran, welches im Hinblick auf die kovalente Bindung des (Poly)Peptids mit reaktiven Gruppen, z.B. Hydroxyl-, Carboxyl-, Amino-, Aldehyd-, Carbonyl-, Epoxy- oder Vinylgruppen, versehen ist. Die Ausführung der Hydrogelschicht und deren Bindung an die Metallschicht, welche gegebenenfalls über eine organische Sperrschicht erfolgt, wurde u.a. in der PCT-Anmeldung WO 90/05303 sowie von Löfas und Johnsson, 1990, beschrieben. In der bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird der Chelatbildner an die reaktiven Gruppen des Hydrogels gebunden.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist der Hydrogelbildner ein Dextran, das als reaktive Gruppen Carboxymethylgruppen aufweist.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das (Poly)Peptid ein Fusions-(Poly)Peptid, das neben seinem biologisch aktiven Abschnitt ein Affinitätspeptid aufweist, das mindestens zwei benachbarte Histidinreste enthält. In diesem Fall ist der Chelatbildner ein Nitrilotriessigsäure (NTA)-Derivat der allgemeinen Formel $Y-R-CH(COOH)-N(CH_2COOH)_2$,

worin R eine Alkylenbrücke des Typs $(CH_2)_n$ - bedeuten kann, die substituiert oder unsubstituiert sein kann, mit der Maßgabe, daß der Substituent nicht nachteilig die Funktion des Chelatbildners beeinflusst, und n eine ganze Zahl 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 oder 10 bedeutet, wobei die Alkylengruppe bei genügender Größe gegebenenfalls auch eine oder mehrere Alken- oder Alkin-Teilstrukturen aufweisen kann,

oder, worin R ein aromatisches Brückenglied bedeuten kann, das aus einem oder mehreren ein- oder mehrkernigen Aromaten, der gegebenenfalls auch ein aromatischer Heterozyklus sein kann, aufgebaut wird,

oder, worin R ein Aralkyl-Brückenglied bedeuten kann, in dem der aromatische Teil entweder direkt oder über eine Alkylgruppe des Typs $(CH_2)_n$ -, worin n eine ganze Zahl 1, 2, 3, 4 oder 5 bedeuten kann, an Y oder an das der Carboxylgruppe benachbarte α -C-Atom gebunden sein kann,

und worin Y eine reaktive Gruppe, insbesondere eine NH_2 -oder eine SH-Gruppe, ist.

Als Beispiele für R seien Methylen, Ethylen, n-Propylen oder iso-Propylen bzw. o-, m-, p-Phenylen oder β, β' -Naphtylen genannt.

Das NTA-Derivat kann auch die allgemeine Formel $Y-R_1-CH(COOH)-N(CHR_2COOH)_2$, aufweisen,

worin R_1 eine Gruppe mit der für R angegebenen Bedeutung sein kann,

und, worin R_2 eine Alkylgruppe des Typs $CH_3(CH_2)_n$ - sein kann, die substituiert, z.B. mit OH oder Cl, oder

unsubstituiert sein kann, und n eine ganze Zahl 1, 2, 3, 4 oder 5 bedeuten kann,

oder, worin R₂ eine verzweigte Alkylgruppe, wie iso-Propyl, t-Butyl oder iso-Butyl sein, kann,

oder, worin R₂ ein aromatisches Brückenglied der für R angegebenen Bedeutung sein kann,

und worin Y eine reaktive Gruppe, insbesondere eine NH₂-oder eine SH-Gruppe, ist.

R bzw. R₁ werden dahingehend ausgewählt, daß einerseits die Komplexierungsfähigkeit im Vergleich zum ungebundenen NTA möglichst wenig beeinflußt wird und andererseits der Abstand zur Oberfläche der Biosensoreinheit genügend gering ist, um die SPR-Phänomene nicht zu irritieren.

R₂ wird dahingehend ausgewählt, daß die Komplexierungsfähigkeit des Chelatbildners mit dem zu chelierenden Metallion sowie mit der zu untersuchenden Substanz nicht negativ beeinflußt wird.

Die Eignung von Substituenten R bzw. R₁, oder R₂ kann z.B. durch Bindungsstudien mit einem geeigneten Liganden, in der Regel einem His(6)-modifizierten Polypeptid, überprüft werden. Substituenten mit negativem Einfluß auf die Komplexierungsfähigkeit reduzieren die Affinität des Liganden; Substituenten, welche die unspezifische Bindung des Liganden beeinflussen, erhöhen die Bindung des Liganden für den nicht mit einem Kation komplexierten Chelator. Y ist eine reaktive Gruppe, mit der der Chelatbildner an die Oberfläche der Biosensoreinheit, insbesondere an die in der Hydrogelmatrix enthaltenen reaktiven Gruppen,

gebunden wird. Die reaktive Gruppe des Chelatbildners wird somit auf die reaktiven Gruppen Oberfläche der Biosensoreinheit, insbesondere der Hydrogelmatrix, abgestellt; besonders bevorzugt ist als reaktive Gruppe Y eine NH_2 -Gruppe, die an die modifizierten Carboxymethylgruppen des Dextrans bindet. Andere reaktive Gruppen Y, die zur kovalenten Bindung geeignet sind, sind SH-Gruppen, die in eine stabile Thioetherbindung überführt werden können. Diese Thioetherbindung ist der Disulfidbindung unter Berücksichtigung der Stabilität in Gegenwart reduzierender Agenzien, wie z.B. Mercaptoethanol, das häufig in der Reinigung oder Synthese von (Poly)Peptiden verwendet wird, überlegen.

Der Chelatbildner kann über seine reaktiven Gruppen mittels für die Kopplung von (Poly)Peptiden bekannter Methoden, z.B. mittels N-Hydroxysuccinimid (NHS) und N-Ethyl-N'-(dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) (s. z.B. Cuatrecasas und Parikh, 1972), an das Hydrogel gebunden werden.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung geeignete Chelatbildner sind in der US-A-4,877,830, der EP-A 253 303, der WO 90/12803 sowie in den Arbeiten von Hochuli und Piesecki, 1992, und Yokoyama et al., 1993, beschrieben. Als Metallionen kommen in erster Linie Übergangsmetallionen in Frage, bevorzugt Übergangsmetallionen der vierten Periode. Darunter sind besonders bevorzugt Ionen des Mangans, Kobalts, Nickels oder Kupfers, worunter Ni^{2+} besonders bevorzugt ist.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung besonders bevorzugt sind als NTA-Derivate die von Hochuli et al., 1987, beschriebene N-(5-Amino-1-carboxypentyl)iminodiessigsäure sowie $\text{N}_\alpha, \text{N}_\alpha$ -Di(1-carboxyethyl)-2,6-

diaminohexansäure und als damit komplexiertes Metallion Nickel.

Bezüglich der Herstellung der Fusions-(Poly)Peptide, die im Hinblick auf die Bindungsfähigkeit an das bevorzugte Metallchelat mindestens zwei benachbarte Histidinreste aufweisen und auf die die vorliegende Erfindung in ihrer bevorzugten Ausführungsform angewendet wird (sog. "His-Tag-Proteine"), wird auf die europäische Patentanmeldung EP-A-282 042 verwiesen; Beispiele dafür sind (His)₆-Proteine, in denen das Affinitätspeptid sechs Histidinreste nebeneinander aufweist.

Im Prinzip ist auch eine direkte Kopplung des Chelatbildners an die Metalloberfläche des Biosensorchips, gegebenenfalls über eine reaktive Gruppen aufweisende organische Sperrschicht, möglich. Bezüglich solcher Sperrschichten wird auf die Offenbarung der WO 90/05303 verwiesen.

Die Immobilisierung des (Poly)Peptids in der Hydrogelmatrix ist jedoch generell bevorzugt, vor allem deshalb, weil sie aufgrund ihrer Struktur eine den physiologischen Verhältnissen im Zellinneren recht ähnliche Struktur darstellt und dadurch für die Untersuchung der Wechselwirkung von Biomolekülen die natürliche Umgebung angenähert wird.

Die vorliegende Erfindung weist den entscheidenden Vorteil auf, daß die Biosensoroberfläche vollständig regenerierbar ist. Damit ist es möglich, Serienversuche unter vergleichbaren Bedingungen durchzuführen.

Die erfindungsgemäße Biosensoreinheit erfüllt die folgenden, an die Regenerierung gestellten Bedingungen:

- 1) Das an das Metallchelat gebundene (Poly)Peptid kann vollständig entfernt werden.

- 2) Bei neuerlicher Beladung verliert die Oberfläche der Biosensoreinheit keine Bindungskapazität für ein zu immobilisierendes (Poly)Peptid.
- 3) Die Bindungseigenschaften des immobilisierten (Poly)Peptids werden nicht beeinflusst.

Zur Regeneration einer metallionengesättigten Chelat-Oberfläche, die einen Liganden, z.B. ein His(6)-Protein, gebunden hat, stehen mehrere Möglichkeiten zur Verfügung. Einerseits kann der Ligand durch Säurebehandlung (z.B. 10 mM Essigsäure) entfernt werden, wobei die Metallionbeladung, abhängig vom verwendeten Metallion, größtenteils stabil bleibt. Falls erforderlich, kann das gebundene Protein zusammen mit dem Metallion durch Zugabe eines weiteren, starken Chelatbildners, wie z.B. 100 mM EDTA, aus der immobilisierten Chelatbindung entfernt werden. Die Stabilität der Metallionenbindung an den Chelatbildner muß im Einzelfall bestimmt werden und ist u.a. von der Stabilität des Liganden-Metallionenkomplexes abhängig. Das Verfahren zur Regeneration der Chelatoberfläche mit anderen Chelatbildnern ist, mit Rücksichtnahme auf die Reproduzierbarkeit des Verfahrens, der ersten Methode vorzuziehen.

Im Einzelfall ist ebenfalls zu überprüfen, ob die Regeneration einer sandwichartigen Oberfläche, z.B. Metallchelate-Ligand 1-Ligand 2 (wobei Ligand 1 ein (Poly)Peptid mit hoher Affinität zur Metallchelatoberfläche darstellt und Ligand 2 ein Makromolekül mit Affinität zu Ligand 1, jedoch nicht zur Metallchelatoberfläche), unter Bedingungen erreicht werden kann, die die Entfernung des Liganden 2 ermöglichen, ohne die Bindung von Ligand 1 an die Chelatoberfläche zu beeinflussen. Insbesondere können hierfür Lösungen mit hohen Salzkonzentrationen

verwendet werden, wie sie in der klassischen Affinitätschromatographie angewendet werden.

Die vorliegende Erfindung kann neben den klassischen Anwendungsgebieten der SPR-Methode vorteilhaft für biochemische Reinigungen eingesetzt werden, um Fraktionen, die das gesuchte Protein enthalten, zu verifizieren. Dieses Verfahren ist den klassischen Reinigungsverfahren nicht nur hinsichtlich der Präzision und Geschwindigkeit sondern auch hinsichtlich der Einfachheit um ein Vielfaches überlegen.

Die Erfindung betrifft in einem weiteren Aspekt einen Biosensor-Kit für die Untersuchung der Wechselwirkung eines (Poly)Peptids mit einem Reaktionspartner mittels SPR. Der Kit enthält in einem ersten eine SPR-Biosensoreinheit, in einem weiteren Behälter einen Chelatbildner, in einem weiteren Behälter ein Salz eines zur Komplexierung mit dem Chelatbildner geeigneten Metalls, in einem oder mehreren weiteren Behältern die Reagenzien für die Aktivierung der Oberfläche der Biosensoreinheit, gegebenenfalls in einem weiteren Behälter ein Reagens zur Deaktivierung der Oberfläche, gegebenenfalls in einem weiteren Behälter ein Reagens zur Regenerierung der Oberfläche sowie gegebenenfalls in einem oder mehreren weiteren Behältern ein oder mehrere Vergleichsproteine.

Vorzugsweise ist eine Oberfläche der Biosensoreinheit eine Hydrogelschicht. Zweckmäßig liegt der Chelatbildner in Form einer tiefgefrorenen Lösung vor, wobei Konzentration und Pufferlösung im Hinblick auf die Kopplung an die Oberfläche der Biosensoreinheit abgestellt sind. Bevorzugte Chelatbildner sind Nitrilotriessigsäure-Derivate, insbesondere N-(5-Amino-

1-carboxypentyl) iminodiessigsäure sowie N_{α}, N_{α} -Di(1-carboxyethyl)-2,6-diaminohexansäure.

Bevorzugt ist das Metallsalz Nickelsulfat, vorzugsweise in Form einer Stammlösung, die im Hinblick auf den gewünschten Beladungsgrad der Oberfläche verdünnt werden kann.

In der bevorzugten Ausführungsform der Erfindung, bei der eine Oberfläche der Biosensoreinheit aus einem Hydrogel mit reaktiven Gruppen, insbesondere aus einem carboxymethyliertem Dextran, besteht, sind die Reagenzien zur Aktivierung der Biosensoroberfläche N-Hydroxysuccinimid und N-Ethyl-N'-(dimethylaminopropyl)carbodiimid, die vorzugsweise in Form tiefgefrorener Lösungen vorliegen, die hinsichtlich Konzentration und Pufferlösung zur Aktivierung geeignet sind. In der bevorzugten Ausführungsform ist das Reagens zur Deaktivierung der nach Kopplung des (Poly)Peptids verbleibenden N-Hydroxysuccinimid-Gruppen an der Biosensoroberfläche Ethanolamin in geeigneter Konzentration und Pufferlösung, vorzugsweise ebenfalls in tiefgefrorener Form.

Das Reagens zur Regenerierung der Biosensor-Oberfläche ist vorzugsweise ein Chelatbildner, insbesondere EDTA.

Die gegebenenfalls in weiteren Behältern vorhandenen Testproteine weisen vorzugsweise ein Affinitätspeptid mit mehreren Histidinresten auf und liegen als Standardlösungen in Konzentrationen und Pufferlösungen vor, die zur Überprüfung der Beladung der Biosensor-Oberfläche geeignet sind.

In den im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeführten Versuchen wurde gemäß der bevorzugten Ausführungsform sowie der Einfachheit halber die Kopplung in der Hydrogelmatrix vorgenommen, weil die kommerziell erhältlichen Biosensoreinheiten von sich aus eine Dextranmatrix aufweisen und die für die direkte Kopplung notwendige Entfernung dieser Hydrogelschicht aus der Biosensoreinheit in einer reproduzierbaren Art und Weise nur schwer durchführbar erscheint.

Zur Bindung der Chelatbildner

N-(5-Amino-1-carboxypentyl)iminodiessigsäure bzw. N_{α}, N_{α} -Di(1-carboxyethyl)-2,6-diaminohexansäure an die Biosensor-Hydrogeloberfläche wurde die Kopplungsmethode mittels N-Hydroxysuccinimid verwendet. Dabei wurde der Chelatbildner, der eine freie, primäre Aminogruppe enthält, an die modifizierte Dextran-Hydrogeloberfläche einer kommerziell erhältlichen Biosensoreinheit (BIACore) kovalent gekoppelt. Als Chelatbildner wurde ein Derivat von Nitrilotriessigsäure synthetisiert, das direkt zur Immobilisierung verwendet werden kann. Die Synthese des Derivats entspricht weitgehend der publizierten Methode (Hochuli et al., 1987; und Europäische Patentschrift 339 389), mit dem Unterschied, daß zur Abspaltung der Schutzgruppe, anstelle der beschriebenen Hydrierung, in Gegenwart von Palladium auf Kohle eine Abspaltung durch eine Säure (Trifluoressigsäure/Trifluormethansulfonsäure) vorgenommen wurde. Das so erhaltene Material kann, da es weitgehend frei von anorganischen Verunreinigungen ist, direkt zur Kopplung an die Oberfläche der Biosensoreinheit eingesetzt werden.

Die Immobilisierung des Chelatbildners wurde nach dem vom Hersteller der Biosensorchips empfohlenen Verfahren

durchgeführt. Da aufgrund des geringen relativen Molekulargewichts der Nitrilotriessigsäurederivate eine direkte Bestimmung der immobilisierten Menge instrumentenbedingt nicht möglich ist, wurde die relative Menge indirekt über die Bestimmung der Bindungskapazität für ein Protein nachgewiesen. Dazu erwies sich kommerziell erhältliches Rinderserumalbumin (BSA) als geeignet.

Es wurde festgestellt, daß die Affinität des Test-(Poly)Peptids für die Nickelionen-freie, mit Chelatbildner modifizierte Biosensorchipoberfläche sehr gering ist, es war keine Bindung an die modifizierte Oberfläche zu beobachten. Die Bindungskapazität der Oberfläche für das Testprotein ist, wie in Beispiel 4 dargestellt, direkt korreliert mit der Nickelionenkonzentration, die zur Beladung verwendet wird. Die Einstellung der Nickelionenkonzentration ermöglicht eine einfache Abstimmung der Bindungskapazität auf die experimentellen Erfordernisse.

Die vorliegende Erfindung betrifft in einem weiteren Aspekt das Nitrilotriessigsäure-Derivat der Formel N_{α}, N_{α} -Di(1-carboxyethyl)-2,6-diaminohexansäure. Dieser Chelatbildner kann wie die bekannten Nitrilotriessigsäure-Derivate auch für die immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie zur Reinigung von Proteinen und Peptiden angewendet werden.

Figurenübersicht:

- Fig. 1: Immobilisierung von N-(5-Amino-1-carboxypentyl)iminodiessigsäure an die Dextranoberfläche einer Biosensoreinheit
- Fig. 2: Indirekte Bestimmung der Beladung der Dextranoberfläche mit N-(5-Amino-1-carboxypentyl)iminodiessigsäure mittels Rinderserumalbumin.
- Fig. 3: Regenerierung der mit Rinderserumalbumin beladenen Biosensor-Oberfläche mittels EDTA
- Fig. 4: Bestimmung der unspezifischen Bindung eines Proteins an die Biosensor-Oberfläche
- Fig. 5: Bestimmung der Bindungsfähigkeit eines Proteins an die Biosensor-Oberfläche in Abhängigkeit der Nickelkonzentration
- Fig. 6: Bindungsfähigkeit verschiedener Proteine an die mit N-(5-Amino-1-carboxypentyl)-iminodiessigsäure/ Ni^{2+} beladene Biosensor-Oberfläche
- Fig. 7: Bindung eines His(6)-modifizierten Proteins an eine mit $\text{N}_\alpha, \text{N}_\alpha$ -Di(1-carboxyethyl)-2,6-diaminohexansäure beladene Biosensor-Oberfläche

Die Erfindung wird anhand der folgenden Beispiele erläutert:

Beispiel 1

a) Synthese von N-(5-Amino-1-carboxypentyl)-iminodiessigsäure

4.17 g Bromessigsäure (Aldrich) wurden in 15 ml 2M NaOH gelöst und auf 0°C gekühlt. Zu dieser Lösung wurden

unter Rühren eine Lösung von 4.2 g N_ϵ -Benzyloxycarbonyl-L-Lysin (Fluka) in 22.5 ml 2 M NaOH langsam zugetropft. Nach 2 Stunden wurde die Lösung auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht weitergerührt. Anschließend wurde die Lösung 2 Stunden auf 50°C erwärmt und dann langsam mit 45 ml 1 M HCl versetzt. Der entstandene Niederschlag wurde abzentrifugiert, mit 0.1 M HCl gewaschen und getrocknet (5 g Produkt, theoretische Ausbeute 5.9 g). 0.87 g des oben erhaltenen Derivates wurden in 10 ml Trifluoressigsäure (Merck) gelöst. Zur klaren Lösung wurde auf Eis 1 ml Trifluormethansulfonsäure (Merck) langsam zugetropft und 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Der gebildete Niederschlag wurde abgetrennt, die Lösung wurde mit 30 ml Wasser versetzt und fast bis zur Trockene eingeeengt. Ein Aliquot dieser Lösung wurde auf einer PD10-Säule (Pharmacia) mit Wasser als Laufmittel aufgetrennt. Die Ninhydrin-positiven, neutralen Fraktionen wurden vereinigt und lyophilisiert.

b) Synthese von N_α, N_α -Di(1-carboxyethyl)-2,6-diaminohexansäure

5.35 g 2-Brompropionsäure (35 mmol) wurden in 15 ml 2 M NaOH gelöst und auf 0°C gekühlt. Unter Rühren wurde eine Lösung von 4.2 g N_ϵ -Benzyloxycarbonyl-L-lysin (15 mmol) in 22.5 ml 2M NaOH bei Raumtemperatur langsam zugetropft und über Nacht bei 70°C gerührt. Die Lösung wurde nach Abkühlung langsam mit 45 ml 1 M HCl versetzt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert, mit 0.1 M HCl gewaschen und getrocknet. Zur Abspaltung der Z-Schutzgruppe wurde der Niederschlag in der minimalen Menge Trifluoressigsäure gelöst und auf Eis 0.1 Volumen Trifluormethansulfonsäure zugetropft. Nach 1.5 h Rühren bei Raumtemperatur wurde die Lösung in 10 Volumen Diethylether getropft. Der Niederschlag

wurde 3x mit Ether gewaschen und getrocknet. Der gebildete Niederschlag wurde abgetrennt, die Lösung wurde mit

30 ml Wasser versetzt und fast bis zur Trockene eingengt. Ein Aliquot dieser Lösung wurde auf einer PD10-Säule (Pharmacia) mit Wasser als Laufmittel aufgetrennt. Die Ninhydrin-positiven, neutralen Fraktionen wurden vereinigt und lyophilisiert. Die Identität der Verbindung wurde mittels Protonen-NMR-Analyse bestätigt.

Beispiel 2

Kopplung von N-(5-Amino-1-carboxypentyl)-iminodiessigsäure an die Dextran-Oberfläche einer SPR-Biosensoreinheit

Alle Schritte der Immobilisierung wurden in dem BIACoregerät (Pharmacia) mit HBS-Puffer (10 mM HEPES (2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure), 150 mM NaCl und 5 mM MgCl₂, pH 7.4) bei 25°C durchgeführt.

Zur Immobilisierung wurden ein Biosensorchip CM5 (Pharmacia Biosensor, Certified Grade) verwendet. (Diese Biosensoreinheit weist eine Hydrogeloberfläche aus carboxymethyliertem Dextran auf.) Die Aktivierung der Hydrogeloberfläche wurde mittels Injektion von 35 µl einer 0.05 M N-Hydroxysuccinimid (NHS)/0.2 M N-Ethyl-N'-(dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC)-Lösung (Flußrate 5 µl/min) durchgeführt. Zur Kopplung der in Beispiel 1 beschriebenen N-(5-Amino-1-carboxypentyl)iminodiessigsäure an die aktivierte Oberfläche wurden 35 µl einer Lösung von 15 mg/ml N-(5-Amino-1-carboxypentyl)iminodiessigsäure in 1 M NaOH bei einer Flußrate von 3 µl/min injiziert. Nicht abgesättigte Bindungsstellen der Oberfläche wurden

durch Injektion von 35 μ l einer 1 M Lösung von Ethanolamin (pH 8.5) abgesättigt (Flußrate 5 μ l/min). Zur Konditionierung der Oberfläche wurden 10 μ l einer 100 mM EDTA-Lösung (pH 8 mit NaOH eingestellt) injiziert und die Oberfläche mit 4 μ l einer 0.1 M $\text{NiSO}_4/0.2$ M $\text{CH}_3\text{-COONa}$ -Lösung beladen (Flußrate 5 μ l/min). Der Verlauf dieser Immobilisierung ist in Fig. 1 anhand der Änderung der Oberflächen-Plasmon-Resonanz dargestellt. Die einzelnen Schritte der Immobilisierung sind in der Figur gekennzeichnet. Da aufgrund seiner geringen relativen Molmasse (M_r 295) die Beladung der Oberfläche mit dem Chelatbildner nicht direkt bestimmt werden kann, wurde die Beladung indirekt bestimmt, indem unter konstanten Fluß (5 μ l/min) 35 μ l einer Lösung von 1 g Rinderserumalbumin (BSA, Sigma) in 100 ml Laufpuffer injiziert wurde. Das Sensorgramm (Fig. 2) zeigt signifikante Bindung des Proteins an die Oberfläche. Anhand von Serienversuchen mit einer standardisierten Lösung dieses Proteins wurde die Reproduzierbarkeit der Oberflächenimmobilisierung bestätigt.

Beispiel 3

Regenerierbarkeit der N-(5-Amino-1-carboxypentyl)iminodiessigsäure-Oberfläche

Um die Regenerierbarkeit der N-(5-Amino-1-carboxypentyl)iminodiessigsäure-Oberfläche zu untersuchen, wurden zwanzigmal in Folge die Oberfläche unter konstantem Fluß (5 μ l/min), wie in Beispiel 2 beschrieben, mit Ni^{2+} -Ionen beladen, 35 μ l einer Lösung von 1 g Rinderserumalbumin (BSA, Sigma) in 100 ml Laufpuffer injiziert und mit EDTA (Ethyldiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure) regeneriert. Zur Berechnung

der in Fig. 3 dargestellten Daten (Basislinie, Injektionsmaximum und gebundenes Protein $t=1$) wurde die Resonanz 30 s vor Injektion des Rinderserumalbumins (Basislinie), 30 s vor Ende der Injektion des Rinderserumalbumins (Injektionsmaximum) und 30 sec nach Injektion des Rinderserumalbumins (Gebundenes Protein $t=1$) bestimmt.

Zur Entfernung des gebundenen Proteins erwies sich EDTA (100 mM, pH 8) als am besten geeignet. Wie in Fig. 3 dargestellt, kann weder ein Aktivitätsverlust der Oberfläche bei neuerlicher Beladung (Injektionsmaximum, gebundenes Protein $t=1$) noch ein Verbleiben des gebundenen Proteins nach Regeneration (Basislinie) festgestellt werden. Da EDTA die chelatgebundenen Nickel-Ionen entfernt, muß nach der Regenerierung der Oberfläche eine erneute Beladung mit Ni^{2+} -Ionen erfolgen.

Beispiel 4

Effekt der Ni^{2+} -Konzentration auf die Protein-Bindungsfähigkeit

Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung des Proteins an die Oberfläche wurden die in Beispiel 1 beschriebene Oberfläche mit EDTA regeneriert, wie in Beispiel 3 beschrieben, und 20 μl einer Testprotein-Lösung bei einer Flußrate von 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ injiziert. Nach erneuter Regeneration der Oberfläche mit EDTA und Beladung mit 4 μl einer 0,1 M NiSO_4 /0,2 M $\text{CH}_3\text{-COONa}$ -Lösung (Flußrate 5 $\mu\text{l}/\text{min}$) wurden abermals 20 μl der Testprotein-Lösung injiziert. Wie in Fig. 4 dargestellt, ist in Abwesenheit von Ni^{2+} keine Bindung an die Oberfläche zu beobachten, nach Beladung der Oberfläche mit Ni^{2+} kann

eine Absättigung der Oberfläche mit Testprotein festgestellt werden.

Um die Bindungsfähigkeit der Oberfläche in Abhängigkeit der Ni^{2+} -Konzentration zu bestimmen, wurde die in Beispiel 1 beschriebene Ni^{2+} -N-(5-Amino-1-carboxypentyl)iminodiessigsäure Oberfläche mit EDTA, wie in Beispiel 3 beschrieben, regeneriert und mit jeweils 4 μl einer Ni^{2+} -Lösung (0,1 M NiSO_4 /0,2 M CH_3COONa , Flußrate 5 $\mu\text{l}/\text{min}$) der angegebenen Konzentrationen beladen. Nach der Beladung mit Nickel wurde Protein injiziert und die Resonanz an $t=1$ bestimmt. Die Auftragung der gemessenen Resonanz gegen die Konzentration der Nickelionenlösung (Fig. 5) zeigt, daß eine vollständige Beladung der Oberfläche mit 4 μl einer 100 μM Ni^{2+} -Lösung erreicht wird. Geringere Konzentrationen zeigen in Abhängigkeit der Konzentration nur unvollständige Beladung der Oberfläche.

Beispiel 5

Bindungsfähigkeit verschiedener Proteine an die N-(5-Amino-1-carboxypentyl)iminodiessigsäure-Oberfläche

Zur Untersuchung des unterschiedlichen Bindungsverhaltens verschiedener Proteine wurden jeweils 40 μl von Lösungen (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in Laufpuffer) eines Hühnerproteins der im Sequenzprotokoll dargestellten Sequenz, modifiziert mit His(6) ((His)6-SCF), von Rinderserumalbumin (Sigma) und von Lysozym aus Eiklar (Sigma) auf eine gemäß Beispiel 2 synthetisierte Biosensoroberfläche injiziert. (Herstellung und Reinigung des Hühnerproteins erfolgten nach Expression in einem kommerziell

erhältlichen Expressionvektor [pQE50, Diagen GmbH] nach dem vom Hersteller des Systems vorgegebenen Reinigungsschema [The QIAexpressionist, Diagen GmbH, Protocol 3, S. 35 sowie Protocol 7, S. 45]. Zur weiteren Reinigung wurde das Protein über eine Anionenaustauschersäule vom Typ HQ/M [Perseptive Biosystems, Freiburg] gereinigt und die Proteinkonzentration mittels Bradford-Protein-Assay [BioRad] bestimmt). Das Bindungsverhalten der einzelnen Proteine ist in Fig. 6 dargestellt: Lysozym (Mr 14300) sowie Rinderserumalbumin (Mr 68000) zeigen eine, trotz der relativ hohen Konzentration, geringe Resonanz; das His(6)-modifizierte Hühnerprotein (Mr 22000) hingegen bindet um ein vielfaches stärker an die Oberfläche. Desweiteren ist zu erkennen, daß Lysozym und Rinderserumalbumin, im Gegensatz zu dem His(6)-modifizierten Hühnerprotein, eine Sättigung der Oberfläche erreichen. Die mit dem His(6)-modifizierten Hühnerprotein zur Sättigung beladene Oberfläche kann zur Suche nach mit diesem Protein interagierenden Proteinen, aus z.B. Zellkulturüberständen von Hühnerzelllinien, verwendet werden, indem Zellkulturüberstände verschiedener Zelllinien injiziert werden. Die Bindung eines interagierenden Partners kann durch die Verstärkung der Resonanz nach der Injektion nachgewiesen werden.

Beispiel 6

Bindung von (His)6-SCF an eine N_{α}, N_{α} -Di(1-carboxyethyl)-2,6-diaminohexansäure-Oberfläche

Es wurde eine N_{α}, N_{α} -Di(1-carboxyethyl)-2,6-diaminohexansäure-Oberfläche unter den exakt gleichen Bedingungen, wie in Beispiel 2 für N-(5-Amino-1-

carboxypentyl)iminodiessigsäure beschrieben, hergestellt.

Zur Untersuchung des Bindungsverhaltens eines (His)6-modifizierten Protein an diese Oberfläche, wurde die Oberfläche mit Ni^{2+} -Ionen beladen und es wurden 40 μl einer Lösung (10 $\mu\text{g/ml}$ in Laufpuffer) eines Hühnerproteins der im Sequenzprotokoll dargestellten Sequenz, modifiziert mit His(6) ((His)6-SCF, beschrieben in Beispiel 5) mit einer Flußrate von 5 $\mu\text{l/min}$ auf diese Oberfläche injiziert. Das Sensorgramm ist in Fig. 7 dargestellt. Die Oberfläche zeigt ein vergleichbares Bindungsverhalten wie die in Beispiel 2 beschriebene, mit N-(5-Amino-1-carboxypentyl)-iminodiessigsäure modifizierte Oberfläche. Anhand von Serienversuchen mit einer standardisierten Lösung des Proteins wurde die Reproduzierbarkeit der Oberflächenimmobilisierung bestätigt.

Literatur

- Cuatrecasas, P. and Parikh, 1972, J. Biochemistry 11, 2291.
- Hochuli, E., H. Döbel und Schacher, A., 1987, J. Chromatography 411, 177-184.
- Hochuli, E. und Piesecki, S., 1992, Methods 4 (San Diego), 66-72.
- Löfas, S. and Johnsson, B., 1990, J. Chem. Soc., Chem. Communications 1526.
- Stenberg, E. et al., 1991, L. of Colloid and Interface Science, 143, 513.
- Yokoyama, T., Sigeko, A. und Masatoshi, K., 1993, Chem. Lett. 2, 383-386.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE INFORMATION:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Boehringer Ingelheim International GmbH
- (B) STRASSE: Binger Strasse 173
- (C) ORT: Ingelheim am Rhein
- (E) LAND: BRD
- (F) POSTLEITZAHL: 55216
- (G) TELEFON: 06132/772282
- (H) TELEFAX: 06132/774377

(ii) ANMELDETTITEL: Verfahren zur Untersuchung der Wechselwirkung von Biomolekülen mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 1

(iv) COMPUTER-LESBARE FORM:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPA)

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 204 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Gallus domesticus
- (G) ZELLTYP: Fibroblast

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Protein
- (B) LÄNGE: 1..204

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

Met Ala Ser His His His His His Gly Gly Ser Ala Gln Ser Ser
1 5 10 15

Cys Gly Asn Pro Val Thr Asp Asp Val Asn Asp Ile Ala Lys Leu Val
 20 25 30
 Gly Asn Leu Pro Asn Asp Tyr Leu Ile Thr Leu Lys Tyr Val Pro Lys
 35 40 45
 Met Asp Ser Leu Pro Asn His Cys Trp Leu His Leu Met Val Pro Asp
 50 55 60
 Phe Ser Arg Ser Leu His Asn Leu Leu Gln Lys Phe Ser Asp Ile Ser
 65 70 75 80
 Asp Met Ser Asp Val Leu Ser Asn Tyr Ser Ile Ile Asn Asn Leu Thr
 85 90 95
 Arg Ile Ile Asn Asp Leu Met Ala Cys Leu Ala Phe Asp Lys Asn Lys
 100 105 110
 Asp Phe Ile Lys Glu Asn Gly His Leu Tyr Glu Glu Asp Arg Phe Ile
 115 120 125
 Pro Glu Asn Phe Phe Ser Leu Phe Asn Ser Thr Ile Glu Val Tyr Lys
 130 135 140
 Glu Phe Ala Asp Ser Leu Asp Lys Asn Asp Cys Ile Met Pro Ser Thr
 145 150 155 160
 Val Glu Thr Pro Glu Asn Asp Ser Arg Val Ala Val Thr Lys Thr Ile
 165 170 175
 Ser Phe Pro Pro Val Ala Ala Ser Ser Leu Arg Asn Asp Ser Ile Gly
 180 185 190
 Ser Asn Thr Ser Ser Asn Ser Asn Lys Glu Ala Leu
 195 200

Patentansprüche

1. Verfahren zur Untersuchung der Wechselwirkung eines (Poly)Peptids mit einem Reaktionspartner mittels einer Biosensoreinheit, in welcher die durch die Wechselwirkung ausgelöste Oberflächen-Plasmon-Resonanz in einer metallischen Schicht an der Grenzfläche zweier für elektromagnetische Strahlung durchlässiger Medien mit unterschiedlichem Brechungsindex bestimmt wird, wobei das Medium mit geringerem Brechungsindex ein wässriges Medium ist, in welchem das (Poly)Peptid in immobilisierter Form vorliegt und mit dem Reaktionspartner in Berührung gebracht wird, dadurch gekennzeichnet, daß das (Poly)Peptid durch ein Metallchelat immobilisiert ist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das wässrige Medium eine biokompatible poröse Matrix, insbesondere ein Hydrogel, ist.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Chelatbildner über reaktive Gruppen des Hydrogels an die Oberfläche der Biosensoreinheit gebunden ist.
4. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Hydrogel ausgewählt ist aus der Gruppe Polysacchararide, wie Dextran, Agarose, Carragen, Alginate, Stärke, Zellulose, oder Derivate davon, oder wasserquellbare organische Polymere, wie Polyvinylalkohl, Polyacrylsäure, Polyacrylamid oder Polyethylenglykol.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Hydrogel ein Dextran ist.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Dextran als reaktive Gruppen Carboxymethylgruppen aufweist.
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das (Poly)Peptid ein Fusions-(Poly)Peptid ist, das neben seinem biologisch aktiven Abschnitt ein Affinitätspeptid mit mindestens einem Histidinrest aufweist und der Chelatbildner ein Iminodiessigsäurederivat ist.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß das (Poly)Peptid ein Affinitätspeptid mit mindestens zwei benachbarten Histidinresten aufweist und der Chelatbildner ein Nitrilotriessigsäure-Derivat der allgemeinen Formel $Y-R-CH(COOH)-N(CH_2COOH)_2$ ist,

worin R eine Alkylengruppe des Typs $(CH_2)_n$ -bedeuten kann, die substituiert oder unsubstituiert sein kann, mit der Maßgabe, daß der Substituent nicht nachteilig die Funktion des Chelatbildners beeinflusst, und n eine ganze Zahl 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 oder 10 bedeutet, wobei die Alkylengruppe bei genügender Größe gegebenenfalls auch eine oder mehrere Alken- oder Alkin-Teilstrukturen aufweisen kann,

oder, worin R ein aromatisches Brückenglied bedeuten kann, das aus einem oder mehreren ein- oder mehrkernigen Aromaten, der gegebenenfalls auch ein aromatischer Heterozyklus sein kann, aufgebaut wird,

oder, worin R ein Aalkyl-Brückenglied bedeuten kann, in dem der aromatische Teil entweder direkt oder über eine Alkylgruppe des Typs $(CH_2)_n$ -, worin n eine ganze Zahl 1, 2, 3, 4 oder 5 bedeuten kann, an Y oder an das der Carboxylgruppe benachbarte α -C-Atom gebunden sein kann,

und worin Y eine reaktive Gruppe, insbesondere eine NH_2 -oder eine SH-Gruppe, ist.

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Nitrilotriessigsäure-Derivat N-(5-Amino-1-carboxypentyl)iminodiessigsäure ist.

10. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß das (Poly)Peptid ein Affinitätspeptid mit mindestens zwei benachbarten Histidinresten aufweist und der Chelatbildner ein Nitrilotriessigsäure-Derivat der allgemeinen Formel $Y-R_1-CH(COOH)-N(R_2CHCOOH)_2$ ist,

worin R_1 eine Gruppe mit der für R in Anspruch 8 definierten Bedeutung sein kann,

und, worin R_2 eine Alkylgruppe des Typs $CH_3(CH_2)_n$ - sein kann, die substituiert, z.B. mit OH oder Cl, oder unsubstituiert sein kann, und n eine ganze Zahl 1, 2, 3, 4 oder 5 bedeuten kann,

oder, worin R_2 eine verzweigte Alkylgruppe, wie iso-Propyl, t-Butyl oder iso-Butyl, sein kann,

oder, worin R_2 ein aromatisches Brückenglied der für R in Anspruch 8 definierten Bedeutung sein kann,

und worin Y eine reaktive Gruppe, insbesondere eine NH_2 -oder eine SH-Gruppe, ist.

11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß das Nitrilotriessigsäure-Derivat $\text{N}_\alpha, \text{N}_\alpha$ -Di(1-carboxyethyl)-2,6-diaminohexansäure ist.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß der Chelatbildner mit einem Übergangsmetallion, insbesondere der vierten Periode, komplexiert wird.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß der Chelatbildner mit Ni^{2+} -Ionen komplexiert wird.
14. Nitrilotriessigsäure-Derivat der Formel $\text{N}_\alpha, \text{N}_\alpha$ -Di(1-carboxyethyl)-2,6-diaminohexansäure.
15. Verwendung des Nitrilotriessigsäure-Derivats nach Anspruch 14 zur Reinigung von Proteinen und Peptiden mittels Metallchelat-Affinitätschromatographie.
16. Biosensoreinheit für die Untersuchung der Wechselwirkung eines (Poly)Peptids mit einem Reaktionspartner mittels Bestimmung der Oberflächen-Plasmon-Resonanz in einer metallischen Schicht an der Grenzfläche zweier für elektromagnetische Strahlung durchlässiger Medien mit unterschiedlichem Brechungsindex, wobei das Medium mit geringerem Brechungsindex ein wässriges Medium ist, dadurch gekennzeichnet, daß an die dem wässrigen Medium zugewandte Oberfläche der Biosensoreinheit ein Chelatbildner, gegebenenfalls

in mit einem Metallion komplexierter Form, gebunden ist.

17. Biosensoreinheit nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß der Chelatbildner an die reaktiven Gruppen einer biokompatiblen porösen Matrix, insbesondere eines Hydrogels, gebunden ist.
18. Biosensoreinheit nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß das Hydrogel ausgewählt ist aus der Gruppe Polysacchararide, wie Dextran, Agarose, Carragen, Alginate, Stärke, Zellulose, oder Derivate davon, oder wasserquellbare organische Polymere, wie Polyvinylalkohl, Polyacrylsäure, Polyacrylamid oder Polyethylenglykol.
19. Biosensoreinheit nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß das Hydrogel ein Dextran ist.
20. Biosensoreinheit nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß das Dextran als reaktive Gruppen Carboxymethylgruppen aufweist.
21. Biosensoreinheit nach einem der Ansprüche 16 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß der Chelatbildner ein Iminodiessigsäurederivat ist.
22. Biosensoreinheit nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß Chelatbildner ein Nitrilotriessigsäure-Derivat der allgemeinen Formel $Y-R-CH(COOH)-N(CH_2COOH)_2$ ist,

worin R eine Alkylengruppe des Typs $(CH_2)_n$ -bedeuten kann, die substituiert oder unsubstituiert sein kann, mit der Maßgabe, daß der Substituent nicht nachteilig die Funktion des Chelatbildners

beeinflusst, und n eine ganze Zahl 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 oder 10 bedeutet, wobei die Alkylengruppe bei genügender Größe gegebenenfalls auch eine oder mehrere Alken- oder Alkin-Teilstrukturen aufweisen kann,

oder, worin R ein aromatisches Brückenglied bedeuten kann, das aus einem oder mehreren ein- oder mehrkernigen Aromaten, der gegebenenfalls auch ein aromatischer Heterozyklus sein kann, aufgebaut wird,

oder, worin R ein Aralkyl-Brückenglied bedeuten kann, in dem der aromatische Teil entweder direkt oder über eine Alkylgruppe des Typs $(CH_2)_n$ -, worin n eine ganze Zahl 1, 2, 3, 4 oder 5 bedeuten kann, an Y oder an das der Carboxylgruppe benachbarte α -C-Atom gebunden sein kann,

und worin Y eine reaktive Gruppe, insbesondere eine NH_2 -oder eine SH-Gruppe, ist.

23. Biosensoreinheit nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß das Nitrilotriessigsäure-Derivat N-(5-Amino-1-carboxypentyl)iminodiessigsäure ist.
24. Biosensoreinheit nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß das (Poly)Peptid ein Affinitätspeptid mit mindestens zwei benachbarten Histidinresten aufweist und der Chelatbildner ein Nitrilotriessigsäure-Derivat der allgemeinen Formel $Y-R_1-CH(COOH)-N(R_2CHCOOH)_2$ ist,

worin R_1 eine Gruppe mit der für R in Anspruch 8 definierten Bedeutung sein kann,

und, worin R₂ eine Alkylgruppe des Typs CH₃(CH₂)_n- sein kann, die substituiert oder unsubstituiert sein kann, und n eine ganze Zahl 1, 2, 3, 4 oder 5 bedeuten kann,

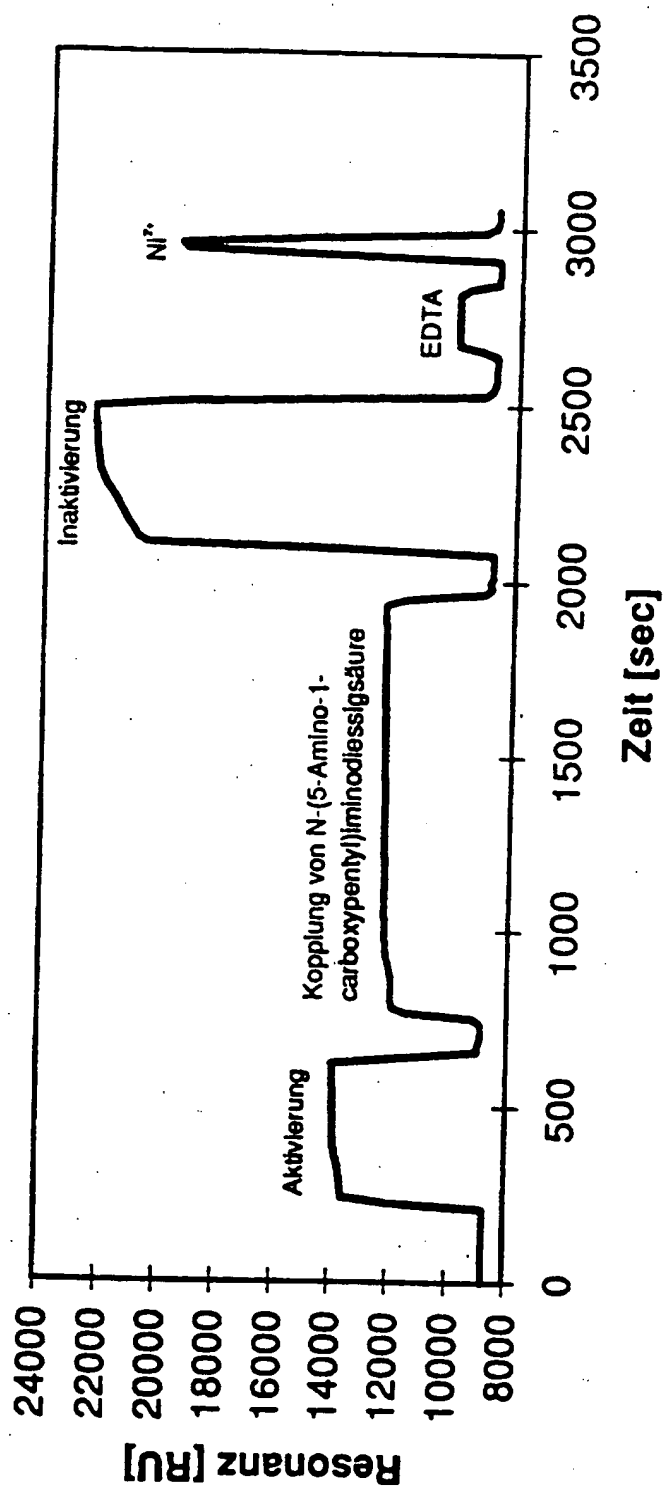
oder, worin R₂ eine verzweigte Alkylgruppe, z.B. iso-Propyl, t-Butyl oder iso-Butyl, sein kann,

oder, worin R₂ ein aromatisches Brückenglied der für R in Anspruch 8 definierten Bedeutung sein kann,

und worin Y eine reaktive Gruppe, insbesondere eine NH₂-oder eine SH-Gruppe, ist.

25. Biosensoreinheit nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß das Nitrilotriessigsäure-Derivat N_α,N_α-Di(1-carboxyethyl)-2,6-diaminohexansäure ist.
26. Biosensor-Kit für die Untersuchung der Wechselwirkung eines (Poly)Peptids mit einem Reaktionspartner mittels SPR, enthaltend in einem ersten Behälter eine SPR-Biosensoreinheit, in einem weiteren Behälter einen Chelatbildner, in einem weiteren Behälter ein Salz eines zur Komplexierung mit dem Chelatbildner geeigneten Metalls, in einem oder mehreren weiteren Behältern Reagenzien für die Aktivierung der Oberfläche der Biosensoreinheit, gegebenenfalls in einem weiteren Behälter ein Reagens zur Deaktivierung der Oberfläche, gegebenenfalls in einem weiteren Behälter ein Reagens zur Regenerierung der Oberfläche sowie gegebenenfalls in einem oder mehreren weiteren Behältern ein oder mehrere Vergleichsproteine.

Fig. 1



2/7

Fig. 2

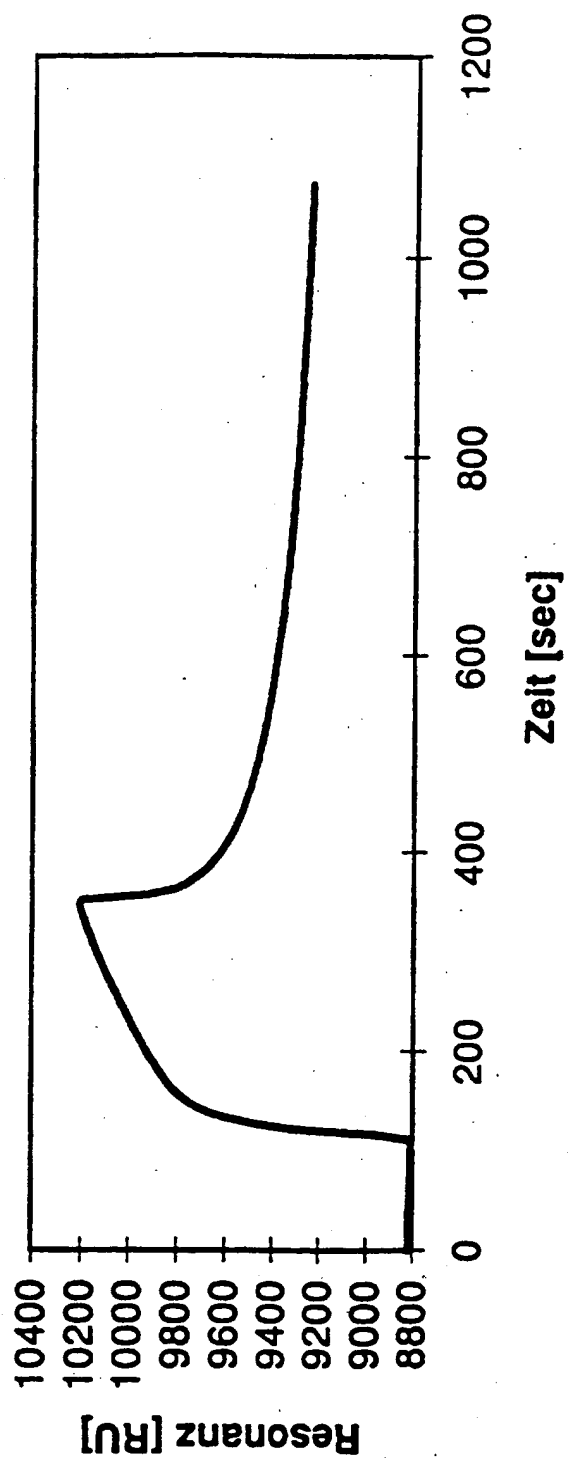


Fig. 3

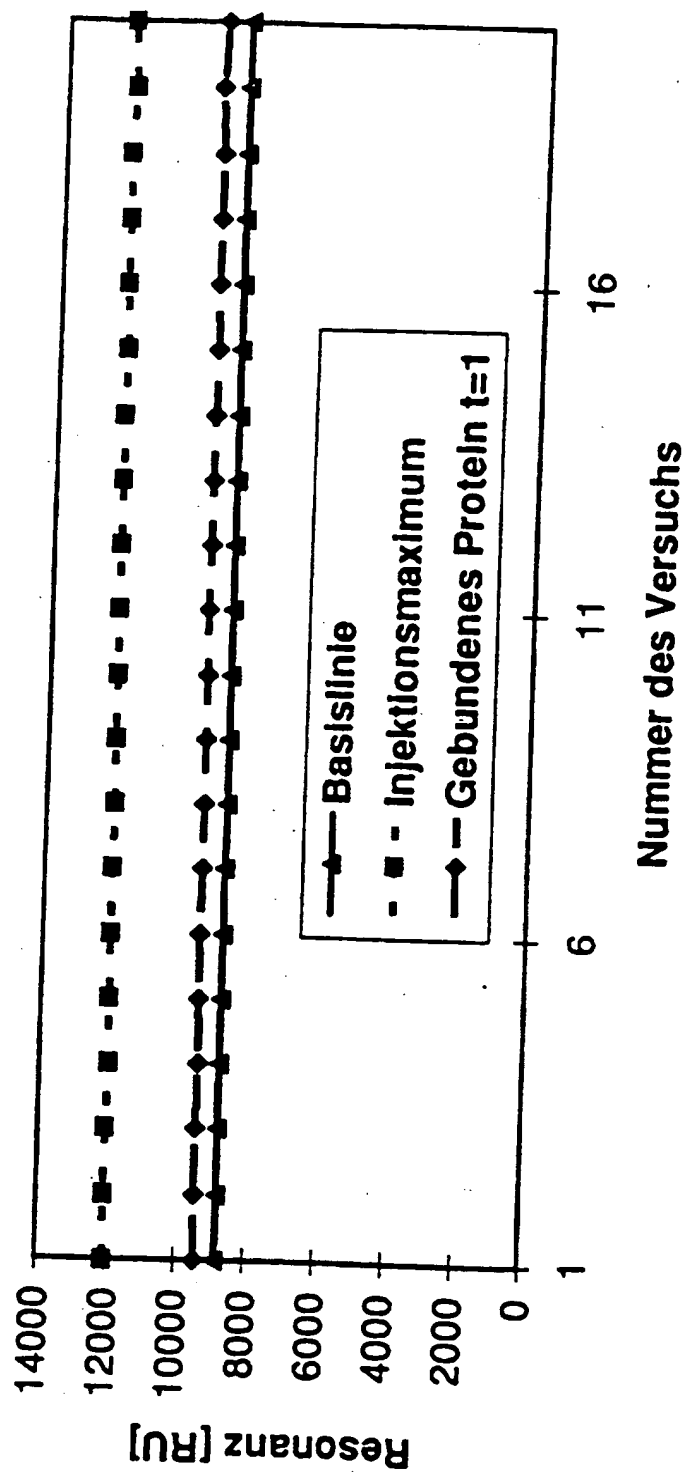
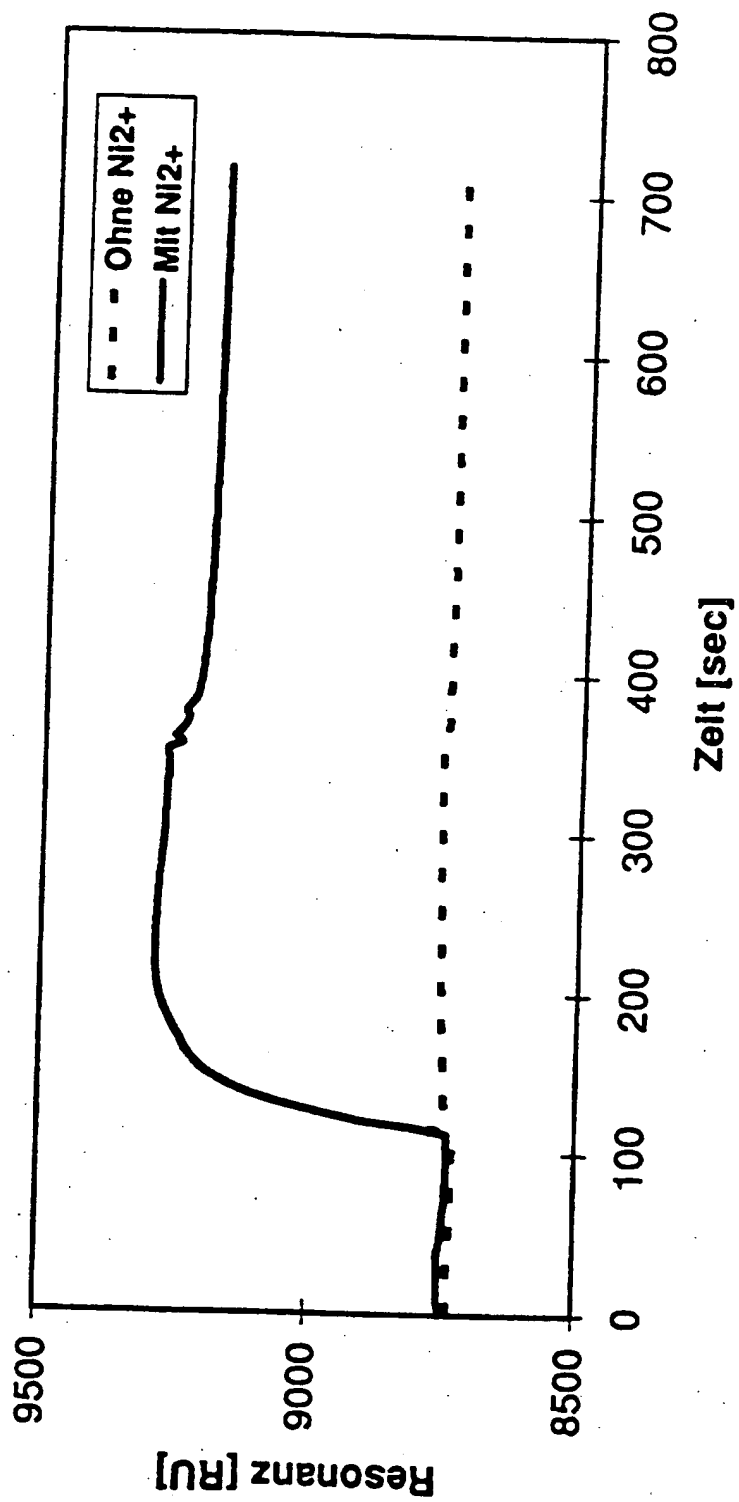


Fig. 4



5/7

Fig. 5

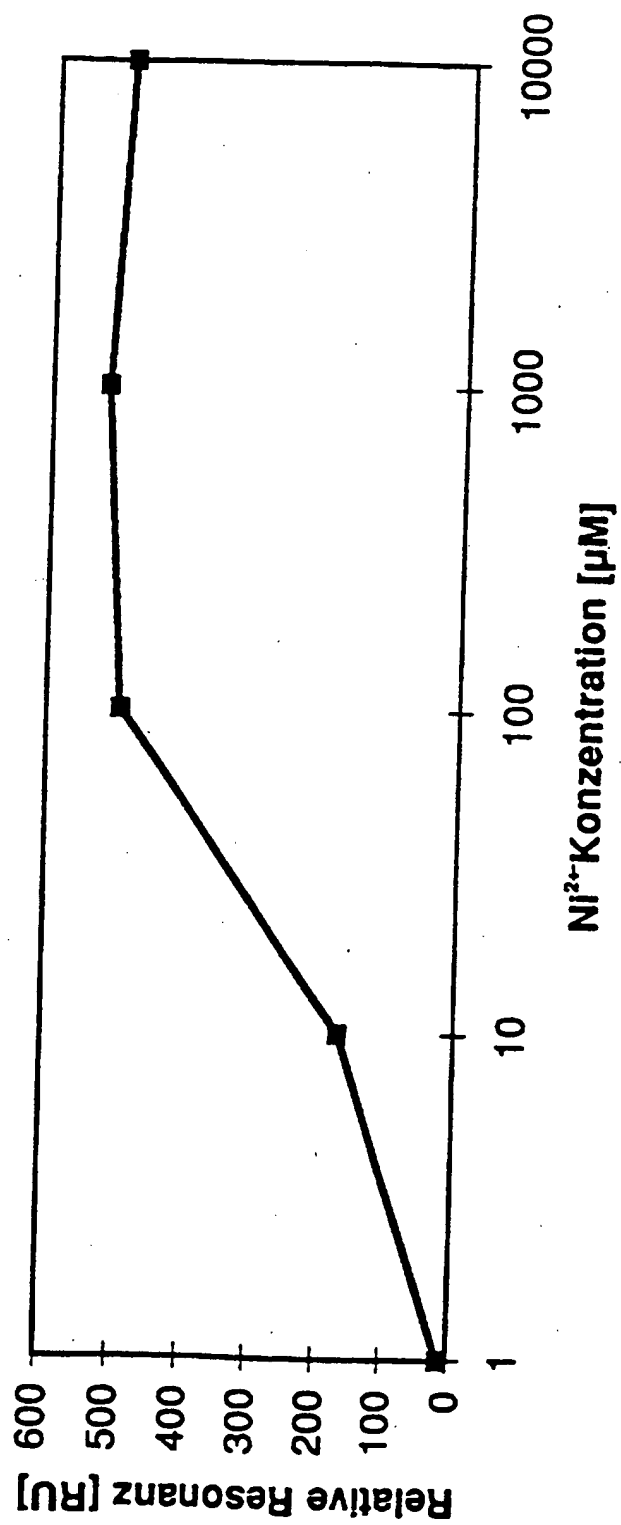
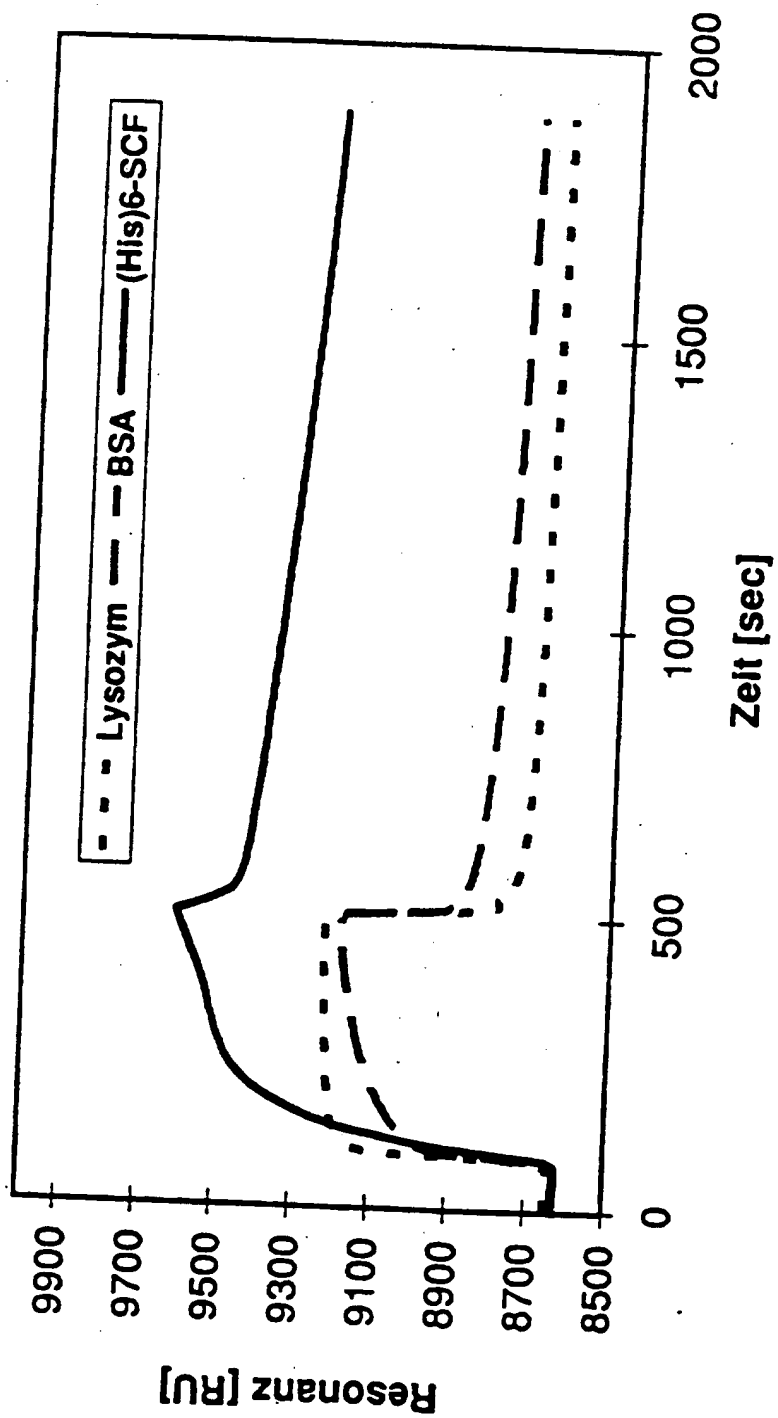


Fig. 6



7/7

Fig. 7

